

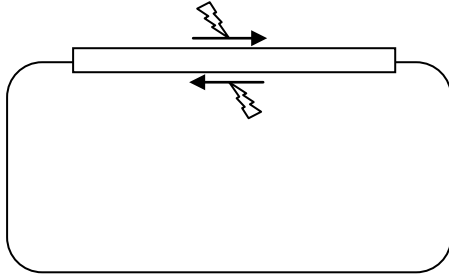
Mutagenesis

目的)

既存の遺伝子に PCR を利用して変異を導入する。

①点変異導入

方法)



- Quik Change® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコールを流用
<http://www.stratagene.com/products/showProduct.aspx?pid=131>
Kit 中では DNA polymerase として PfuTurbo® DNA polymerase を使用しているが、
私たちは PrimeSTAR® HS DNA polymerase (TaKaRa) を使用している。
配列によっては PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (TaKaRa) を選択。
- 2 本鎖プラスミドを鋳型として使用する。
- Thermal Cycling による変異導入後、鋳型プラスミドは DpnI によって切断、除去する。
この制限酵素 (DpnI) はメチル化・ヘミメチル化された DNA を切断するため、鋳型プラスミドの調整には Dam⁺大腸菌株 (一般的に使われている大腸菌はほぼ Dam⁺) を使用すること。
- プライマーは変異導入部位に対して 2 本の相補的合成プライマーを準備する。
完全一致である必要はなく、他の部分との相同性などから多少ずれてもよい

試薬)

- PrimeSTAR® HS DNA polymerase ; TaKaRa, Code no.R010A
- Dpn I ; NEB, R0176S
- ddH₂O

フローチャート)

プライマーの設計・入手



試薬調整・Thermal Cycling



Dpn I によるテンプレートの切断



大腸菌にトランスフォーム、培養



コロニーピッキング・ミニプレップ・シーケンス確認

手順)

1) プライマーの設計・発注

変異導入部位がプライマーのほぼ中央になるようにする。
可能であれば、制限酵素サイトができるようにすると確認が容易になる。
プライマーは 25-45mer で、TM 値が 78°C以上になるようにする
 $Tm=81.5+0.41(\%GC)-675/N-\%mismatch$

N:primer length in bases

Stratagene の HP で TM 値が計算できる。

<http://www.stratagene.com/homepage/default.aspx>

テクニカルサポート>technical toolbox>Mutagenesis>Stratagene Quikchange Primer Tm Calculator

2) 試薬調整

Template	1 μ l	(total 5-50ng 要条件検討)
5x PrimeSTAR® Buffer	10 μ l	
d NTP Mixure(2.5mM each)	4 μ l	
Primer1 (100ng/μ l)	1.25 μ l	Primer 濃度の単位に注意
Primer2 (100ng/μ l)	1.25 μ l	
ddH ₂ O	32 μ l	他の試薬量によって調節する
PrimeSTAR®HS DNA Polymerase(2.5U/ μ l)	0.5 μ l	
Total	50 μ l	

* template が多いと、DpnI で消化されずに残り、mutant<template となることがある。

3) Thermal Cycling

温度	時間	サイクル数
98°C	30sec	1
98°C	10sec	12
55°C	5sec	
68°C	1min/kb	
4°C	保存	1

*PCR の変性温度、変性・アニーリング時間条件は PrimeSTAR® HS DNA Polymerase の条件に従った。

*サイクル数・アニーリング温度は Quik Change®のプロトコールに従った。

*サイクル数は 1 塩基置換の場合。その他は Quik Change®のプロトコールを参照。

4) Dpn I によるテンプレートの切断

Thermal Cycling が終了した Sample に DpnI 1 μ l を加え、37°C1 時間。

*PCR 産物 10 μ l を泳動してもバンドはほとんど見えない。泳動確認は不要。

5) 大腸菌にトランスフォーム、培養

コンピテントセル (DH5 α など) 50 μ l に 4) 5 μ l をトランスフォームする。

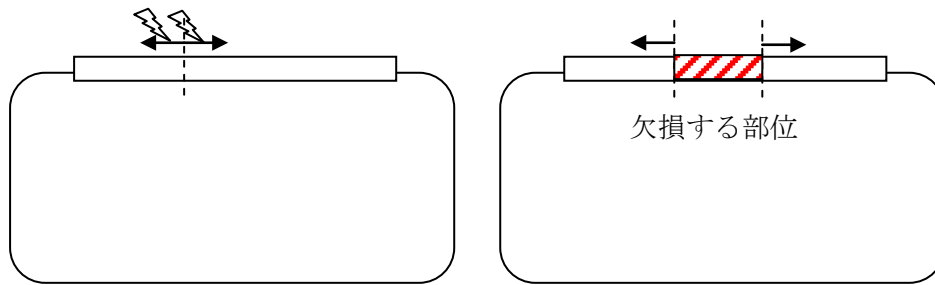
6) コロニーピックアップ・ミニプレップ・シークエンス確認

成功例)

- ◇ 目的; 1 point mutation の導入
 - ◇ template; 4.7kb のプラスミド DNA、50ng・10ng の2本で条件検討
 - ◇ Primer ; length=21mer, mismatch= 1base, GC=9mer, Tm=62.2°C
Tm 計算時に Mutation 部位は GC の中に含まない。
Mutation 導入部位は、Primer の中央とした。
 - ◇ PCR 産物の電気泳動ではバンドは確認できなかった。
 - ◇ Template 量 50ng,10ng とも4コロニーずつピックアップ、制限酵素チェックはすべて OK
 - ◇ Sequence を確認したところ
template 50ng は4本すべて mutation なし
template 10ng は4本すべて mutation あり
 - ◇ うち1本について必要部分を全 sequence 確認。目的以外の mutation はなかった。
-
- * Primer の設計は必ずしもプロトコルどおりでなくてもよいかもしれない。ただし、template のほかの部位に対する相同性には注意が必要。50%程度の相同性でうまくいかなかった例もある。
 - * 合成 Primer には合成時に予期せぬエラーが入っていることがあるので、Primer 部分も含めた Sequence が必要。
 - * 今回 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を使用した理由は、PfuTurbo® DNA polymerase と同等かそれ以上の正確性を持ち、より安価であったため。
 - * すべてのステップが順調であれば、約1週間で mutant を得ることが可能。

②近傍 2 箇所同時に点変異を導入, 欠損ミュータントの作製

方法)



ワンデイミュータージェネシス法を用いる

試薬)

- PrimeSTAR® HS DNA polymerase ; TaKaRa, Code no.R010A
増幅産物のほとんどは平滑末端になっている
- Dpn I ; NEB, R0176S
- T4 Polynucleotide Kinase ; TaKaRa, Code No.2021A
プライマーの 5'末端がリン酸化されている場合は不要。
- T4DNA ligase& 2x buffer; Promega pGEM-T Vector Systems の ligase、buffer を流用

フローチャート)

プライマーの設計・入手



試薬調整・Thermal Cycling



Dpn I によるテンプレートの切断



電気泳動・切り出し・ゲルからの回収・精製



リン酸化・ライゲーション



大腸菌にトランスフォーム、培養



コロニーピックアップ・ミニプレップ・シーケンス確認

手順)

1) プライマーの設計・発注

変異導入部位がプライマーのほぼ中央になるようにする。

* 成功例：32bp 離れた 2 塩基に mutation 導入を試みた場合

各 28mer (mutation 部位は primer 中央ではない)、 $T_m=78.1^{\circ}\text{C}$ と 66.9°C の組合せ
欠損 mutant を作成する場合には、フレームに注意する。

* 21mer, $T_m=60-72^{\circ}\text{C}$ で成功している。Fw,Rv で T_m が異なっても成功。

2) 試薬調整

Template (2 ng/μl)	1 μ l	
5x PrimeSTAR® Buffer	10 μ l	
d NTP Mixure(2.5mM each)	4 μ l	
Primer1 (10pmol)	1 μ l	
Primer2 (10pmol)	1 μ l	
ddH ₂ O	32.5 μ l	他の試薬量によって調節する
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase(2.5U/ μ l)	0.5 μ l	
Total	50 μ l	

3) Thermal Cycling

温度	時間	サイクル数
98°C	30sec	1
98°C	10sec	30
55-65°C	5sec	
72°C	1min/kb	
72°C	2min	1
4°C	保存	1

*アニーリング温度はプライマーの T_m による。要条件検討。

4) Dpn I によるテンプレートの切断

Thermal Cycling が終了した Sample に DpnI 1 μ l を加え、37°C1 時間。

5) 電気泳動・切り出し・ゲルからの回収・精製

電気泳動は Agarose gel/TAE で行う

ゲルからの回収・精製は市販の kit を使用

(私たちは Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega 社)で回収・精製後、EtOH
沈殿をしている)

TE 10 μ l に溶解、うち 1 μ l を電気泳動でチェック

6) リン酸化・ライゲーション

PCR 産物	1 μ l	
dH ₂ O	3 μ l	
2x ligation buffer	5 μ l	(ATP を含有)
T4 DNA ligase	0.5 μ l	
T4 Polynucleotide Kinase	0.5 μ l	
<hr/>		
Total	10 μ l	

↓ 25°C 1時間

7) 大腸菌にトランスフォーム、培養

コンピテントセル (DH5 α など) 100 μ l に全量をトランスフォーム。

8) コロニーピッキングアップ・ミニプレップ・シーケンス確認

参考文献；

①ワンデイミュータジェネシス

今井嘉紀 実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編 (羊土社) 2002年発行

② Imai, Y. et al.: Nucl. Acids Res., 19 : 2785, 1991